

Review

DOI: 10.2478/10004-1254-60-2009-1922

ANALIZA POLIKLORIRANIH DIBENZO-*p*-DIOKSINA I POLIKLORIRANIH DIBENZOFURANA U TLU I SEDIMENTU

Darija KOŽUL i Snježana HERCEG ROMANIĆ

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb, Hrvatska

Primljen u listopadu 2008.

Prihvaćen u siječnju 2009.

U ovom je radu prikazan pregled postupaka analize polikloriranih dibenzo-*p*-dioksina (PCDD) i polikloriranih dibenzofurana (PCDF), koji se skraćeno nazivaju dioksini, u tlu i sedimentu. Navedeni spojevi nastaju kao nusprodukti u raznim procesima spaljivanja, a zbog svoje postojanosti i toksičnosti opasni su za zdravlje ljudi i životinja. Tlo i sediment zbog visokog sadržaja organske tvari mogu akumulirati dioksine te na taj način postaju važni sekundarni izvori njihove emisije. Analitički postupak određivanja dioksina u takvim je uzorcima složen jer se analit, prisutan u tragovima, mora odvojiti od interferencija, ali i drugih klasa organskih onečišćivala, prisutnih u puno višim koncentracijama. Nakon skupljanja uzorka slijedi ekstrakcija spojeva odgovarajućim otapalom, pročišćavanje ekstrakta od neželjenih spojeva te kvalitativna i kvantitativna analiza.

Na kraju ovoga preglednog rada dane su razine PCDD-a i PCDF-a nađene u uzorcima tla i sedimenta.

KLJUČNE RIJEČI: *analitički postupci, okoliš, onečišćenje, organoklorovi spojevi, postojana organska onečišćivala*

Organoklorovi spojevi posljednjih su nekoliko desetljeća u žarištu zanimanja i istraživanja zbog svoje rasprostranjenosti u čitavom okolišu i toksičnih učinaka na zdravlje ljudi i životinja. Najrašireniji iz te skupine spojeva su poliklorbifenili (PCB), organoklorovi pesticidi (OCP) te dioksini o kojima će biti riječi u ovome preglednom radu. Grupi spojeva koja se kraće naziva dioksini pripadaju poliklorirani dibenzo-*p*-dioksini (PCDD) i poliklorirani dibenzofurani (PCDF). PCB i OCP su spojevi koji su zbog svojih povoljnih fizikalno-kemijskih svojstava sintetizirani za komercijalnu primjenu dugi niz godina. S druge strane, dioksini su nepoželjni nusprodukti u različitim procesima spaljivanja pri temperaturama između 200 °C i 400 °C, pogotovo uz prisutnost metala kao katalizatora te ugljika i klora. Također su sporedni produkti i kod proizvodnje PCB-a i OCP-a. Svim tim spojevima zajednička su svojstva postojanost,

lipofilnost, toksičnost, bioakumulacija i mogućnost prenošenja zrakom na velike udaljenosti i dio su skupine postojanih organskih onečišćivala (engl. *persistent organic pollutants*; POPs). Zbog tih svojstava nalaze se zajedno u svim dijelovima okoliša i u njima se raspodjeljuju. Najčešće je prvi primalac onečišćenja zrak. U zraku su prisutni u plinskoj fazi i vezani na površini čestica prašine. Zbog prisutnosti organske tvari u tlu i sedimentu POPs se vrlo čvrsto vežu te se čestice tla i sedimenta ponašaju kao okolišni skupljači i rezervoari. Na taj način te čestice postaju sekundarni izvor onečišćenja voda, biljaka, životinja te naposljetku i samog čovjeka. Zbog svoje lipofilnosti kod ljudi i životinja se skupljaju u tkivima koja sadržavaju mast (jetra, bubrezi, masno tkivo) te u serumu i mlijeku. Kod laboratorijskih životinja tretiranih ovim spojevima uočen je širok spektar toksičnih i biokemijskih učinaka, dok su neki od tih

učinaka uočeni i kod ljudi nakon nesreća ili duže profesionalne izloženosti. Danas je proizvodnja i upotreba PCB-a i OCP-a zabranjena i/ili ograničena, a u prepoznatim izvorima dioksina i furana njihova se emisija nastoji ograničiti ili potpuno eliminirati. Unatoč tomu, oni su još uvijek prisutni u svim dijelovima okoliša i među njima kruže te se na taj način njihova razina zadržava na tzv. ustaljenom stanju. Da bi se procijenila njihova raspodjela u okolišu, a time i moguća izloženost ljudi, organoklorova onečišćivala se analiziraju u hrani, zraku, tlu, sedimentu, bilju, raznim životinjskim vrstama i ljudima. Od ukupno 210 kongenera PCDD-a i PCDF-a, najčešće se pojedinačno analiziraju najtoksičniji kongeneri kojih ima ukupno 17.

Ovaj pregledni rad će prikazati metode analize PCDD-a i PCDF-a u tlu i sedimentu. Analiza navedenih spojeva kompleksan je analitički zadatak bez obzira na to o kojoj se matrici radilo jer se analiti moraju odvojiti od interferirajućih spojeva u matrici, ali i od preostalih organoklorovih onečišćivala (PCB-a, OCP-a, PAH-ova) koji su u uzorcima prisutni u višim koncentracijama. Analitički postupak uključuje ekstrakciju analita, pročišćavanje uzorka tijekom kojeg se PCDD/PCDF nastoje dobiti u zasebnoj frakciji i naposljetku kvalitativnu i kvantitativnu analizu. Svaki dio ovako složenog analitičkog postupka mora biti djelotvoran i selektivan kako bi se dobili što točniji i precizniji rezultati.

Kratice:

ASE - ekstrakcija uz povišeni tlak i temperaturu (engl. accelerated solvent extraction, ili engl. pressurized liquid extraction; PLE)
CALUX - metoda kemijske aktivacije gena za ekspresiju luciferaze (engl. chemically activated luciferase gene expression)
CID - disocijacija izazvana sudarima (engl. collision induced dissociation)
EI - ionizacija elektronima (engl. electron impact)
ELISA - enzimski imunoanaliza (engl. enzyme-linked immunosorbent assay)
GCxGC - opsežna dvodimenzionalna plinska kromatografija (engl. comprehensive two-dimensional chromatography)
HRGC - plinska kromatografija visokog razlučivanja (engl. high resolution gas chromatography)
HRMS - spektrometrija masa visokog razlučivanja (engl. high-resolution mass spectrometry)
HS-SPME - analiza para iznad otopine povezana s mikroekstrakcijom na čvrstoj fazi (engl. headspace solid-phase microextraction)
IT - ionska stupica (engl. ion trap)
MAE - ekstrakcija uz pomoć mikrovalova (engl. microwave-assisted extraction)
MDGC - višedimenzionalna plinska kromatografija (engl. multidimensional gas chromatography)
OCP - organoklorovi pesticidi (engl. organochlorine pesticides)

PAH - poliaromatski ugljikovodici (engl. poliaromatic hydrocarbons)
PCDD - poliklorirani dibenzo-p-dioksini (engl. polychlorinated dibenzo-p-dioxins)
PCDF - poliklorirani dibenzofurani (engl. polychlorinated dibenzofurans)
POPs - postojana organska onečišćivala (engl. persistent organic pollutants)
PCB - poliklorbifenili (engl. polychlorinated biphenyls)
RRF - relativni faktor odgovora (engl. relative response factor)
SFE - ekstrakcija fluidom pri superkritičnim uvjetima (engl. supercritical fluid extraction)
SIM - praćenje odabranih iona (engl. selected ion monitoring/ mode)
SOX - ekstrakcija u aparaturi po Soxhletu (engl. Soxhlet extraction)
TEF - faktor ekvivalentne toksičnosti (engl. toxic equivalency factor)
TEQ - ekvivalent toksičnosti (engl. toxic equivalent)
TOF - vrijeme leta (engl. time of flight)
USE - ultrazvučna ekstrakcija (engl. ultrasonic extraction)
WHO - Svjetska zdravstvena organizacija (engl. World Health Organization)

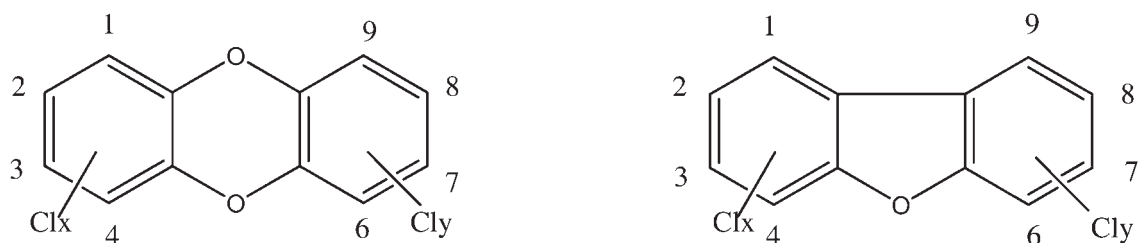
FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA I TOKSIČNOST PCDD-A I PCDF-A

PCDD i PCDF su dvije grupe spojeva koji se sastoje od dva benzenska prstena međusobno povezana preko kisikovih atoma. Opće strukturne formule prikazane su im na slici 1.

Ime kongenera izvodi se iz pozicija supstituiranih klorovih atoma i stupnja kloriranosti, a ovisno o broju (od jedan do osam) i položaju klorovih atoma vezanih na ugljikove atome (položaji 1 do 4 i 6 do 9) postoji ukupno 75 kongenera PCDD-a i 135 kongenera PCDF-a. Grupe kongenera s istim brojem Cl atoma nazivaju se homolozi. Zbog jednostavnosti homologne grupe se često nazivaju kraće imenima, npr. tetrakloro dioksini i furani su skraćeno TCDD i TCDF, dok su potpuno klorirani oktakloro kongeneri OCDD i OCDF.

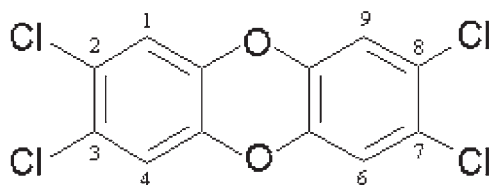
Svi PCDD i PCDF su krutine s visokim temperaturama tališta i niskim tlakovima para, nepolarni su i lipofilni. Vrlo su stabilni u prisutnosti jakih kiselina i baza te jakih redukcijskih i oksidacijskih spojeva. Slabo su topljivi u vodi, a topljivost, kao i hlapljivost, pada s porastom broja klorovih atoma.

Kongeneri potpuno klorirani s bočnih strana (položaji 2, 3, 7 i 8) najotporniji su na razgradnju te sedam kongenera PCDD-a i deset PCDF-a s takvom supstitucijom, uz to što su otporni na razgradnju, spadaju i u grupu najtoksičnijih dioksina, dok je najtoksičniji 2,3,7,8-TCDD koji je Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*; WHO)



Slika 1 Strukturne formule PCDD-a i PCDF-a ($x+y=8$)

svrstala u skupinu karcinogena za ljude (1). Njegova struktura prikazana je na slici 2.



Slika 2 Struktura 2,3,7,8-tetraklor-dibenzo-p-dioksina (2,3,7,8-TCDD-a)

Toksičnost dioksina povezana je s njihovim velikim afinitetom prema vezanju na specifični stanični protein poznat kao aril hidrokarbon receptor (AhR) koji je povezan s ekspresijom velikog broja gena. Toksični učinci ovih spojeva uključuju utjecaj na imunosni i reproduktivni sustav, negativan utjecaj na rast organizma i razvoj središnjega živčanog sustava, a također su potencijalno karcinogeni.

Negativne utjecaje duže izloženosti niskim koncentracijama dioksina teško je procijeniti zbog toga što se u svim uzorcima živog i neživog dijela okoliša nalaze smjese organoklorovih spojeva, i to zajedno s još mnogim drugim spojevima, pa je teško dokazati specifičnu vezu između izloženosti određenom spoju i učinka. Iako je toksični potencijal pojedinih organoklorovih spojeva različit, ukupni toksični učinak je uvijek aditivan.

Ljudi su bili izloženi visokim koncentracijama dioksina ponajprije u slučaju nesreća. Jedan od prvih slučajeva je trovanje hranom kontaminiranom dioksinima u Americi 1957. godine poznat pod imenom "pileća edemska bolest" ("chick oedema disease"). Istodobno, američka je vojska rabila herbicidnu formulaciju onečišćenu dioksinima pod imenom "narančasti agens" ("agent orange")

u Vijetnamskom ratu kako bi neprijatelju uništila zaklon od lišća na drveću. Godine 1968. mnogo se Japanaca otrovalo dioksinima onečišćenim rižinim uljem, a godinu kasnije eksplodirala je kemijska tvornica u Sevesu u Italiji (2). Najizraženiji simptom uočen kod ljudi izloženih dioksinima su klorakne, a ostali simptomi su probavne smetnje, loša fizička i mentalna sposobnost, znojenje, drhtavica, oticanje vjeđa i udova itd. (3).

Nakon što su krajem sedamdesetih godina dioksini otkriveni u lebdećem pepelu iz nizozemskih i švicarskih spalionica gradskog otpada (2), počelo je razdoblje njihova intenzivnog istraživanja koje traje sve do danas.

Zbog velikog broja kongenera od kojih nisu svi jednako toksični, najtoksičnijemu 2,3,7,8-TCDD-u (na temelju *in vivo* i *in vitro* istraživanja) dodijeljena je vrijednost faktora ekvivalentne toksičnosti (engl. *toxic equivalency factor*; TEF) 1, dok je ostalim toksikološki važnim kongenerima dodijeljena vrijednost TEF-a s obzirom na njihovu toksičnost u odnosu prema onoj TCDD-a. TEF-vrijednosti pojedinih kongenera razlikuju se ovisno o vrsti organizma (4). U literaturi se najčešće pojavljuju I-TEF (tzv. internacionalni TEF) i WHO-TEF koje su dogovorili znanstvenici iz zemalja pripadnica Organizacije sjevernoatlantskog saveza, odnosno Svjetske zdravstvene organizacije (3).

Umnožak koncentracije individualnog kongenera s njegovom TEF-vrijednosti predstavlja ekvivalent toksičnosti (engl. *toxic equivalent*; TEQ) pojedinog spoja prema 2,3,7,8-TCDD-u, dok zbroj takvih umnožaka predstavlja ekvivalent toksičnosti smjese prema 2,3,7,8-TCDD-u (5). TEQ-vrijednost predstavlja najjednostavniji način za procjenu toksičnosti smjese dioksina i njezina potencijalnog rizika za zdravlje. Na tablici 1. navedeni su toksikološki značajni dioksini, koji se ujedno i najčešće analiziraju, i njihove TEF-vrijednosti.

Tablica 1 Toksikološko značajni PCDD i PCDF i njihove TEF vrijednosti (2)

Spoj	WHO-TEF
PCDD	
2,3,7,8-TCDD	1
1,2,3,7,8-PeCDD	1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01
OCDD	0,0003
PCDF	
2,3,7,8-TCDF	0,1
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01
OCDF	0,0003

IZVORI EMISIJE I RASPODJELA U OKOLIŠU

Prije industrijalizacije jedini izvori PCDD-a i PCDF-a bile su vulkanske erupcije i šumski požari, no te su koncentracije zanemarivo niske u odnosu na one koje su rezultat industrijske aktivnosti. U najvećoj mjeri PCDD i PCDF nastaju pri procesima spaljivanja komunalnog, opasnog i medicinskog otpada te otpadnog mulja iz kanalizacije koji se odvijaju pri visokim temperaturama, a glavni su sudionici ugljik, klor i metalni katalizator. Također mogu nastati i pri proizvodnji čelika i drugih metala u industriji metala. Pojavljuju se kao nusprodukti u procesima proizvodnje kloriranih produkata kemijske industrije kao što su klorirani pesticidi i herbicidi, poliklorbifenili. Jedan od izvora je i industrija papira gdje se klor rabi za izbjeljivanje. Izvori su još i ispušni plinovi iz automobila, cigaretni dim, slučajno spaljivanje plastike itd. (6). Emisija dioksina u okoliš nastoji se smanjiti različitim reduktivnim mjerama kao što su razvrstavanje smeća prije spaljivanja, poboljšanje procesa spaljivanja, recikliranje ili kompostiranje smeća.

Ponašanje pojedinačnih kongenera u okolišu ovisi o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima kao što su hlapljivost, topljivost u vodi i lipofilnost. Manje

klorirani kongeneri su hlapljiviji i topljiviji u vodi nego više klorirani kongeneri koji su lipofilniji. Te razlike utječu na raspodjelu ovih spojeva u različitim dijelovima okoliša, kao što su tlo, voda i zrak. PCDD i PCDF ispušteni u okoliš ne zadržavaju se u jednom njegovu dijelu nego podliježu različitim procesima prijenosa i transformacije ovisno o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima kao i svojstvima samog okoliša.

Zbog svoje lipofilnosti većina PCDD-a i PCDF-a u tlu je sorbirana na organsku tvar te na taj način ostaju imobilizirani na površini tla. Moguća je njihova difuzija kroz tlo, a isto tako i hlapljenje s površine i brzine ovih procesa smanjuju se povećanjem sadržaja organske tvari u tlu i sniženjem temperature. Dioksini su kemijski vrlo stabilni te podliježu jedino fotokemijskoj razgradnji pri čemu nastaju niže klorirani kongeneri. U manjoj mjeri dioksini u tlu podliježu mikrobiološkoj razgradnji. Brzina razgradnje je sporija kod više kloriranih kongenera, a utječu i položaji klorovih atoma te agregatno stanje spoja. U plinskoj fazi fotorazgradnja je vrlo brza, u ili na krutoj fazi fotokemijskom transformacijom preferirano se gube klorovi atomi na položajima 1, 4, 6 i 9 što dovodi do stvaranja toksičnijih spojeva, dok je u otopinama preferiran gubitak klorovih atoma s položaja 2, 3, 7 i 8 pri čemu nastaju manje toksični spojevi (6).

U vodenom dijelu okoliša većina dioksina je vezana za suspendiranu tvar te se zatim taloži na dno, dok dio ulazi i u hranidbeni lanac. Manji dio koji se nalazi u vodenj fazi može hlapljenjem prijeći u atmosferu. Kao i u tlu, i u vodi je moguća fotokemijska i mikrobiološka razgradnja dioksina. Razgradni procesi vrlo su spori i vremena poluživota dioksina u tlu i sedimentu su barem nekoliko godina (6). Vertikalni profili sedimenta mogu otkriti promjene u unošenju i akumuliranju PCDD/PCDF-a pa se rabe za praćenje regionalnih i vremenskih trendova onečišćenja vode dioksinima (7, 8, 9, 10).

Zrak je dio okoliša koji je najizloženiji unosu dioksina, a isto tako igra važnu ulogu u njihovu daljnjem prijenosu. U zraku dioksini mogu biti u plinskoj fazi i/ili vezani na čestice, pri čemu vezanje na čestice ovisi o tlaku para spoja i slobodnoj površini čestice. Kongeneri s više klorovih atoma skloniji su adsorpciji na čestice, a taj je proces intenzivniji pri nižim temperaturama. Dioksini iz zraka prelaze u druge dijelove okoliša, ali se zračnim masama mogu prenijeti i na velike udaljenosti. Dioksini se iz zraka uklanjaju kemijskom i fotokemijskom razgradnjom

ako su u plinskoj fazi te taloženjem ako su vezani na čestice. Veće se čestice učinkovitije uklanjaju iz atmosfere bilo mokrim ili suhim taloženjem, dok se manje čestice uklanjaju mokrim taloženjem (6).

Zbog lipofilnosti i otpornosti na metaboličku razgradnju dioksini ulaze i akumuliraju se u hranidbenom lancu zbog čega vrste koje se nalaze na njegovu vrhu imaju najviše razine dioksina. Glavni izvor ljudske (neprofesionalne) izloženosti dioksinima je konzumacija hrane životinjskog podrijetla, pri čemu najveći doprinos daju meso, riba i mliječni proizvodi (11). U sisavcima, a tako i u čovjeku, dioksini se akumuliraju u tkivima koja sadržavaju masti te u mlijeku i serumu.

ANALIZA PCDD-A I PCDF-A

PCDD/PCDF se u prirodi nalaze u niskim razinama kao što su pikogram ili femtogram po gramu matrice ovisno o uzorku (12). Stoga je za izolaciju i pročišćavanje uzoraka nuždan postupak sastavljen od više koraka kako bi se mogli odrediti analiti u tragovima u složenim okolišnim i biološkim uzorcima. Analitički postupak sastoji se od ekstrakcije analita, pročišćavanja kako bi se analiti dobili u što čistijoj frakciji te kvalitativne i kvantitativne analize. Analiza dioksina koji se u tragovima nalaze u složenim uzorcima zahtijeva iscrpnu ekstrakciju, opsežno pročišćavanje i vrlo osjetljive metode detekcije. Tradicionalno se za to upotrebljavala ekstrakcija u aparaturi po Soxhletu, pročišćavanje na nekoliko kolona i na poslijetku kapilarna plinska kromatografija sa spektrometrijom masa visokog razlučivanja. Takva je analiza fizički i vremenski zahtjevnija te je potrebno mnogo ulaganja u opremu, kemikalije i obrazovanje stručnjaka. No danas dosta interesa pobuđuju bioanalitičke tehnike koje omogućuju puno brže, jeftinije i opsežnije analize dioksina, pogotovo kad se radi o vrlo onečišćenim uzorcima koje treba hitno analizirati.

Skupljanje i priprema uzoraka

Tlo se najčešće uzorkuje skupljanjem nekoliko poduzoraka koji onda pomiješani predstavljaju reprezentativni uzorak za pojedinu lokaciju. Moguće je raditi analize dioksina u različitim slojevima tla, ali se ispod 10 cm dubine obično pronalaze niže razine dioksina (6). Kod sedimenta se najčešće rade analize dioksina u pojedinim slojevima kojima se točno može odrediti starost te se na taj način može i vremenski pratiti trend onečišćenja dioksinima.

Prije same analize uzorci tla i sedimenta suše se na zraku ili se liofiliziraju, a homogenost uzorka se postiže mljevenjem i prosijavanjem uzorka.

Ekstrakcija PCDD-a i PCDF-a iz uzoraka tla i sedimenta

Analiza kompleksnih uzoraka često zahtijeva odvajanje analita od matrice uzorka, odnosno ekstrakciju. U idealnom slučaju taj bi postupak trebao biti brz, jednostavan i jeftin, trebao bi dati kvantitativne analitičke povrate bez gubitaka ili razgradnje analita i trebao bi dati otopinu analita koja je dovoljno koncentrirana da se može izravno mjeriti bez potrebe za koncentriranjem. Kod složenih uzoraka okoliša ove je zahtjeve teško, ako ne i nemoguće zadovoljiti. Najčešća metoda ekstrakcije dioksina iz tla i sedimenta je ekstrakcija u aparaturi po Soxhletu, no zbog nekih nedostataka ona se nastoji zamijeniti bržim, jeftinijim i učinkovitijim metodama ekstrakcije.

Ekstrakcija u aparaturi po Soxhletu (engl. *Soxhlet extraction*; SOX) jedna je od najčešćih metoda ekstrakcije PCDD-a i PCDF-a iz tla i sedimenta. U aparaturi recirkulira grijano otapalo za ekstrakciju iz tikvice okrugla dna kroz uzorak smješten u stakleni ili celulozni cilindar u gornjem dijelu aparature. Pare otapala kondenziraju u hladilu smještenom na vrhu i kaplju dolje na uzorak te ekstrahiraju analit iz matrice. Kako se ekstraktor puni otapalom tako se puni i sifonska cijev, a kad se ona napuni, otapalo iz gornjeg dijela ekstraktora odlazi u tikvicu. Otapalo se zagrijava i ciklus se nastavlja (2). Nedostaci ove metode su velike količine otapala potrebne za ekstrakciju, dugo vrijeme same ekstrakcije (između 12 i 48 sati) te potreba za koncentriranjem otopine analita nakon ekstrakcije.

Ekstrakcija mućkanjem s odgovarajućim otapalom najjednostavnija je metoda ekstrakcije dioksina iz uzoraka tla i sedimenta. Ekstrakcija može biti jednokratna ili višekratna, a nakon nje se ekstrakti filtriraju i koncentriraju. Opis takve metode ekstrakcije može se naći u radu Shana i suradnika (13).

Ultrazvučna ekstrakcija (engl. *ultrasonic extraction*; USE) jednostavan je postupak ekstrakcije u kojem je posuda s uzorkom i odgovarajućim organskim otapalom stavljena u ultrazvučnu kupelj. Prednosti ovog postupka su njegova relativna brzina, jednostavnost i to što ne zahtijeva skupe instrumente, a nedostaci veliki volumen otapala i moguća potreba višekratne ekstrakcije. Ekstrakti se nakon završene ekstrakcije moraju filtrirati.

Otapala za ekstrakciju koja se rabe u prvom su redu toluen, a zatim heksan, diklormetan, benzen te smjese otapala kao što su [ψ (diklormetan, aceton)=50:50] i [ψ (2-propanol, diklormetan)=50:50] (14).

Novija metoda ekstrakcije je ekstrakcija fluidom pri superkritičnim uvjetima (engl. *supercritical fluid extraction*; SFE) pri čemu se najčešće rabi pokretna faza CO_2 pri superkritičnim uvjetima. Prednost ove metode ekstrakcije je njezina brzina koja se postiže zbog velikog koeficijenta difuzije i male viskoznosti fluida. Selektivnost fluida može se mijenjati promjenama tlaka i u manjoj mjeri temperature, što omogućuje prilagođavanje uvjeta ekstrakcije prema tipu analita. Budući da su većina superkritičnih fluida pri sobnim uvjetima plinovi, analiti se jednostavnim otpuštanjem tlaka ili uvođenjem u malu količinu odgovarajućeg otapala dobivaju u otopini. Nadalje, fluidi su inertni, čisti, netoksični i jeftini, pogotovo najčešće upotrebljavani CO_2 čije superkritične uvjete nije teško postići ($T_c=31^\circ\text{C}$, $p_c=7,4\text{ Pa}$). Polarnost fluida može se povećati dodatkom polarnog modifikatora (metanol, aceton).

Superkritični CO_2 se rabi za ekstrakciju dioksina iz tla i sedimenta. Potvrđeno je da se vrijeme ekstrakcije može smanjiti s 48 h na samo 2 h s analitičkim povratima jednakim ili višim od onih postignutih u aparaturi po Soxhletu (12).

U radu iz 2002. godine Mannila i suradnici (15) su rabili metodu koja se sastoji od automatizirane SFE sa simultanim pročišćavanjem s pomoću stupice s adsorbensom za brzu analizu dioksina u uzorcima tla. PCDD/PCDF su ekstrahirani 60 minuta upotrebom CO_2 kod tlaka od 40,5 MPa i temperature od 100°C bez modifikatora. Stupica za pročišćavanje s malom količinom aktivnog ugljena pomiješanog s Celitom učinkovito je skupljala dioksine nakon SFE. Nakon završetka ekstrakcije koekstrahirane nečistoće su sa stupice uklonjene eluiranjem heksanom, a dioksini toluenom. Metoda se pokazala dobrom za kvantitativnu izolaciju PCDD/PCDF-a iz tla i određivanje njihovog TEQ-a.

U novijem radu dioksini su iz tla ekstrahirani ekstrakcijom pri supkritičnim uvjetima uz vodu kao pokretnu fazu. Dielektrična konstanta (pokazuje lakoću polarizacije) vode pri supkritičnim uvjetima je niska i slična onima za metanol ($\epsilon\approx 30$) ili heksan ($\epsilon\approx 3$), što znači da može otopiti nepolarne sastojke koji inače nisu topljivi u vodi.

Ekstrakcija uz pomoć mikrovalova (engl. *microwave-assisted extraction*; MAE) rabi se za ekstrakciju različitih analita u krutim matricama, pa

tako i za ekstrakciju dioksina iz uzoraka tla i sedimenta (17) i pri tome omogućuje kraća vremena ekstrakcije uz smanjenje utroška otapala. MAE je proces u kojem se mikrovalnom energijom zagrijava otapalo koje je u kontaktu s uzorkom i time pospješuje prelazak spojeva od interesa iz uzorka u otapalo. Mikrovalna ekstrakcija nepolarnih spojeva topljivijih u nepolarnim nego u polarnim otapalima najčešće zahtijeva kompromis pri izboru otapala zato što odgovarajuća nepolarna otapala najčešće nemaju sposobnost interakcije s mikrovalovima koja ovisi o dielektričnoj konstanti otapala (što je ϵ veći, jača je interakcija). Zato se u mnogim slučajevima ekstrakcija mora provoditi smjesom otapala različitih polarnosti.

Dvije su tehnologije primjene mikrovalne energije na uzorak: a) u zatvorenim posudama (pod kontroliranim tlakom i temperaturom) i b) u otvorenim posudama (pri atmosferskom tlaku). Obično se nazivaju tlačna MAE (PMAE), odnosno fokusirana MAE (FMAE) (18). Upotrebom zatvorenih posuda za ekstrakciju mogu se koristiti temperature više od temperature vrelišta otapala što dodatno smanjuje vrijeme ekstrakcije, a također omogućuje analizu više uzoraka odjednom. Ekstrakcija se poboljšava pri povišenim temperaturama jer se povećava difuzija otapala u unutarne dijelove matrice i olakšava desorpcija sastojaka s aktivnih mjesta matrice. U zatvorenim sustavima važan je parametar i tlak, no on je direktno ovisan o temperaturi i njegovom se kontrolom izbjegava raspad ekstrahiranih sastojaka. MAE pokazuje manju selektivnost u usporedbi sa SFE što rezultira koekstrakcijom interferencija pa uzorci zahtijevaju dodatno pročišćavanje prije analize. Smanjena učinkovitost MAE u usporedbi sa SFE također se uočava kad se analiziraju tla s visokim sadržajem organske tvari (12).

Ekstrakcija uz povišeni tlak i temperaturu (engl. *accelerated solvent extraction*; ASE, naziva se još engl. *pressurized liquid extraction*; PLE) moderna je metoda ekstrakcije predstavljena od kompanije Dionex Inc. (Sunnyvale, CA, SAD) 1995. godine (2). Uzorak (često pomiješan sa sredstvom za sušenje) smješten je u ekstrakcijskoj ćeliji od nehrđajućeg čelika koja je pod tlakom, zagrijava se i puni ekstrakcijskim otapalom. Velika učinkovitost ekstrakcije postiže se uporabom organskog otapala u tekućoj fazi na temperaturama iznad temperature vrelišta otapala. Povišena temperatura povećava brzine difuzije, topljivost analita i time ubrzava ekstrakciju (2). Ekstrakcijska ćelija od nehrđajućeg čelika može raditi na temperaturama do 200°C i tlakovima do 20 MPa.

Visoki tlak može olakšati ekstrakciju spojeva koji se nalaze u porama matrice. Komercijalno dostupni ASE-sustavi mogu se lako automatizirati i paralelno analizirati do 24 uzorka. Glavni nedostaci metode su što je nakon ekstrakcije potrebno čišćenje i što je oprema skuplja od one za SFE i MAE (12).

U novije vrijeme omogućeno je da se unutar ekstrakcijskog postupka može integrirati i pročišćavanje. To se radi tako da se u ćeliju za ekstrakciju dodaju različiti dodaci koji omogućuju pročišćavanje, u slučaju gdje se analizira tlo dodaje se komercijalno dostupni aktivni ugljen (2). ASE može biti povezan s automatiziranim procesom pročišćavanja na više kolona pa se više uzoraka može pripremiti za analizu bez ručne pripreme.

Za ekstrakciju dioksina u uzorcima tla i sedimenta ASE se rabila u radu Robinsona i suradnika (19).

Razvijena je nova metoda analize para iznad otopine povezana s mikroekstrakcijom na čvrstoj fazi (engl. *headspace solid-phase microextraction*; HS-SPME) za snimanje PCDD/F-a u jako onečišćenim uzorcima tla. Zbog male hlapljivosti dioksina i njihova snažnog vezanja na tlo teško ih je ekstrahirati iz uzoraka tla s pomoću SPME. Kako bi se poboljšala učinkovitost ekstrakcije, uzorak tla je grijan i podvrgnut ultrazvuku, dok je alkohol hlađen cirkulacijom kroz hladnu kupelj iskorišten za hlađenje gornjeg dijela posude s uzorkom i polidimetilsiloksanskim vlaknom (aparatura prikazana na slici 3.). Metoda zahtijeva 1 sat pripreme uzorka i nimalo organskog otapala te se pokazala brzom, učinkovitom i jeftinom tehnikom za brzo snimanje PCDD/PCDF-a u uzorcima tla (20).

Pročišćavanje i frakcioniranje

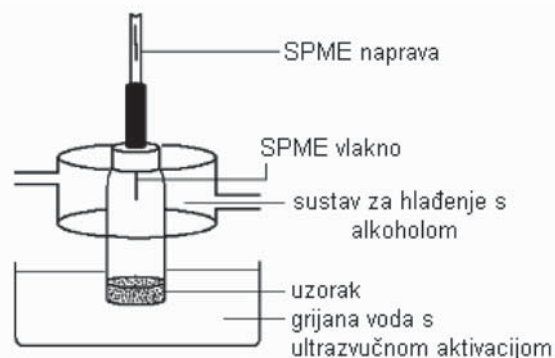
PCDD i PCDF su grupa onečišćivala koja je uvijek povezana s onečišćivalima veće molekularne mase kao što su poliklorbifenili i poliaromatski ugljikovodici (PAH) koji prilikom ekstrakcije koekstrahiraju s PCDD-ima i PCDF-ima. Uz to ekstrahiraju se i razni drugi spojevi iz organske tvari tla i sedimenta koji kasnije smetaju u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi. Sve te interferencije najčešće su prisutne u višim koncentracijama od koncentracija PCDD-a i PCDF-a. Svrha je pročišćavanja odvojiti spojeve koji koekstrahiraju s analitima i po potrebi/želji odvojiti analite u različite frakcije. Način pročišćavanja ovisi o ekstraktu, no najčešći i najučinkovitiji način pročišćavanja je adsorpcijska kromatografija sa sorbensima kao što su silikagel, aluminijev oksid, Florisil ili aktivni ugljen. Te se kolone ili pripremaju

ručno tako što se sorbens stavlja u staklene kolone ili su komercijalno dostupne. Eluensi koji se pritom najčešće rabe jesu heksan, toluen, diklormetan ili smjese tih otapala.

Kolone bazičnog Al_2O_3 rabe se za odvajanje dioksina od uobičajenih halogeniranih sastojaka koji se nalaze u okolišu kao što su PCB i pesticidi. Komplementarni alat za takvo frakcioniranje je sorbens od aktivnog ugljena. Zbog svog afiniteta prema planarnim aromatskim sustavima, posebno onima sa spojenim aromatskim prstenovima i elektronegativnim supstituentima, sorbensi na bazi ugljena mogu frakcionirati planarne dioksine, furane i koplanarne PCB od ostalih razreda aromatskih spojeva poboljšavajući pročišćavanje uzorka (12). Ugljen snažno veže planarne analite pa da bi se oni nakon frakcioniranja mogli ukloniti, potrebna je njegova disperzija na neutralnome mediju kao što je Celit ili silikagel a isto tako i kontrola veličine čestica. Dobri povrati za PCDD/F i koplanarne PCB zadržane na prednjem kraju kolone dispergirano ugljena dobivaju se povratnim ispiranjem kolone planarnim otapalom kao što je toluen. Mikrokolone ispunjene Florisilom (aktiviranim na 130°C) također se rabe za odvajanje PCDD-a, PCDF-a i koplanarnih PCB-a od ortosupstituiranih PCB-a. Kolona je prvo eluirana s heksanom i zatim s diklormetanom kako bi se dobile dvije frakcije. U prvoj zaostaju ortosupstituirani PCB, a u drugoj ostali navedeni spojevi (14). Za pročišćavanje PCDD/F-a i PCB-a rabile su se i porozne grafitne kolone (PGC) i sorbensi bazirani na 2-(1-pirenil)etil fazi (PYE) (12).

Za ekstrakciju tla i sedimenta najučestalije je pročišćavanje sastavljeno od tri stupnja koja uključuju kolone od silikagela, Al_2O_3 (ili Florisila) i aktivnog ugljena.

Budući da su bili poznati učinkoviti sorbensi, počelo se raditi na automatizaciji pročišćavanja



Slika 3 Aparatura za HS-SPME metodu

kako bi se ubrzao i pojednostavnio postupak između ekstrakcije i analize, pa su tako danas dostupni razni automatizirani uređaji za pročišćavanje nekoliko ekstrakata odjednom, u najvećem broju slučajeva od smetajućih lipida. U radu Abada i suradnika komercijalni uređaj Power-Prep™ (Fluid Management Systems Inc., Watertown, MA, SAD) koji se temelji na uporabi kromatografskih kolona pod tlakom ispitan je za primjenu u analizi okolišnih uzoraka. Primjenjuju se kolone silikagela, bazičnog Al_2O_3 i aktivnog ugljena, a cijeli postupak traje samo jedan sat te omogućuje automatsku analizu većeg broja uzoraka (1). Taj isti automatski sustav pročišćavanja upotrijebljen je u radu Sanze i Fabrellasa za pročišćavanje ekstrakata uzoraka tla i sedimenta (17).

Kvalitativna i kvantitativna analiza

Da bi se dioksini mogli analizirati, potrebna je vrlo dobra separacijska metoda, kao i vrlo osjetljiva metoda detekcije. Zbog hlapljivosti dioksina za separaciju je najprimjeranija i najkorištenija plinska kromatografija visokog razlučivanja (engl. *high-resolution gas chromatography*; HRGC). Upotrebljavaju se kapilarne kolone različitih duljina (najčešće 60 m i 30 m) s različitim stacionarnim fazama kao što su DB-5, SP-2332 i DB-Dioxin, a temperaturni program pećnice najčešće se sastoji od dva ili tri stupnja s tim da je najčešće u prvom stupnju porast temperature najbrži. S pomoću nepolarnih kolona kao što je DB-5 mogu se razdvojiti homologne grupe dioksina, a isto tako je moguće međusobno razdvajanje 2,3,7,8 supstituiranih kongenera, ali ne i njihovo razdvajanje od netoksičnih kongenera. Polarnim kolonama kao što je DB-Dioxin poboljšava se moć razdvajanja, ali ona i dalje nije potpuna. TCDF je najteže razdvojiti i za to je potrebna srednje polarna kolona. Zbog svega navedenog odabir kolone ovisi o tipu uzorka, pa se nepolarne kolone često rabe za analizu bioloških uzoraka koji najčešće sadržavaju samo 2,3,7,8-supstituirane kongenere, dok se polarne kolone rabe za analizu okolišnih uzoraka (6).

Najprikladnija i daleko najkorištenija je svakako detekcija spektrometrijom masa visokog razlučivanja (engl. *high-resolution mass spectrometry*; HRMS) praćenjem odabranih iona (engl. *selected ion monitoring/mode*; SIM) s pomoću izotopnog razrjeđenja (engl. *isotope dilution*) kao kvantifikacijske metode. HRGC-HRMS pruža točnu, osjetljivu i selektivnu analizu (1) te identifikaciju svakoga pojedinačnog kongenera i smatra se referentnom metodom za analizu dioksina (21). Ono što HRGC-HRMS čini daleko najboljim sustavom za analizu dioksina

prilagodljiva selektivnost spektrometrije masa koja se postiže mogućnošću promatranja specifičnih karakterističnih iona u spektru sastojaka u kombinaciji s usporedbom retencijskih vremena kod plinske kromatografije (4).

Upotreba izotopnog razrjeđenja s komercijalno dostupnim $^{13}\text{C}_{12}$ obilježenim unutarnjim standardima omogućuje točnu identifikaciju pikova na temelju usporedbe retencijskih vremena između običnih (^{12}C) i obilježenih (^{13}C) sastojaka, kao i točnu kvantifikaciju usporedbom visina/površina pikova (21).

Najčešća tehnika ionizacije je ionizacija elektronima (engl. *electron impact*; EI) jer često nastaju i molekularni ion i ioni fragmenata što omogućuje određivanje relativne molekulske mase i strukture molekule. Pouzdan način identifikacije je mjerenje omjera $^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$ u pikovima analita, dok se dodatne informacije o strukturi mogu dobiti promatranjem tipičnih gubitaka COCl -fragmenata iz molekularnog iona (6). Velika prednost ove metode je ta što nastaju vrlo ponovljivi spektri što omogućuje identifikaciju nepoznatih spojeva usporedbom s knjižnicom spektara. No, u nekim slučajevima, EI zbog jake fragmentacije nije dovoljno osjetljiva za detekciju vrlo niskih koncentracija sastojaka u uzorcima okoliša. Tada se primjenjuju blaže metode ionizacije kao što je kemijska ionizacija (CI) kod koje je fragmentacija manja i može se kontrolirati izborom plina reagensa i koja ovisno o vrsti nastalih iona može biti pozitivna (PCI) ili negativna (NCI). Za analizu izomera pogodnija je CI u odnosu na EI jer različiti izomeri daju različite spektre ovisno o reakciji s plinom reagensom, dok su spektri različitih kongenera kod EI međusobno vrlo slični (22). Kod NCI najzastupljeniji ion je negativno nabijeni molekularni ion, M^- , a ovisno o strukturi molekule i eksperimentalnim uvjetima, može doći i do daljnje fragmentacije. Kod PCDF-a nastaje neuobičajeni $[\text{M}-34]^-$ ion zbog primanja H i gubitka Cl; dok je kod PCDD-a fragmentacija "normalnija" i nastaje $[\text{M}-35]^-$ ion zbog gubitka klora (6).

Od analizatora masa u većini HRGC-HRMS-instrumenata rabi se sektorski analizator koji ione razdvaja upotrebom izmjeničnog magnetskog i električnog polja (2), no sve je veća upotreba drugih analizatora masa kao što su kvadrupol (engl. *quadrupole*), ionska stupica (engl. *ion trap*; IT) i analizator koji mjeri vrijeme leta (engl. *time of flight*; TOF) (22).

Nedostacima HRGC-HRMS smatraju se veliki troškovi, dužina cijelog postupka analize i nemogućnost

lakog postupka skeniranja velikog broja uzoraka u slučaju velikih kriza.

Osim spektrometrije masa visokog razlučivanja (HRMS) za analizu PCDD-a i PCDF-a rabi se i tandemna spektrometrija masa (MS/MS) koja daje točnije kvantitativne rezultate od HRMS u slučajevima kad je potrebna veća selektivnost.

U radu Fabrellasa i suradnika dioksini su iz uzoraka tla i sedimenta ekstrahirani toluenom 24 sata u aparaturi po Soxhletu, nakon uparavanja ekstrakti su pročišćeni na višeslojnoj koloni silikagela, koloni bazičnog Al_2O_3 i naposljetku na koloni ispunjenoj PX-21 aktivnim ugljenom. Za analizu se rabila plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa s kvadrupolnom ionskom stupicom niskog razlučivanja (HRGC-MS/MS) (23). Tehnika se bazira na zadržavanju određenih iona unutar stupice i njihovu postepenom slanju prema detektoru prema rastućem omjeru mase i naboja. U MS/MS ioni produkta se dobivaju spremanjem odabranih iona prekursora u kvadrupolnu stupicu i zatim njihovim fragmentiranjem disocijacijom izazvanom sudarima (engl. *collision-induced dissociation*; CID).

Broj onečišćivala u tragovima u različitim okolišnim matricama koji se želi analizirati postao je toliko velik da je gotovo nemoguća njihova analiza na jednoj GC-koloni. Način na koji se rezolucija može povećati jest uporaba višedimenzionalne plinske kromatografije (engl. *multidimensional gas chromatography*; MDGC) koja omogućuje kvantitativno i ponovljivo prenošenje malih nerazdvojenih frakcija eluata s prve na drugu kolonu. I u ovom tipu kromatografije se zbog svoje selektivnosti i specifičnosti za detekciju najčešće rabi MS s tehnikom praćenja odabranih iona (24).

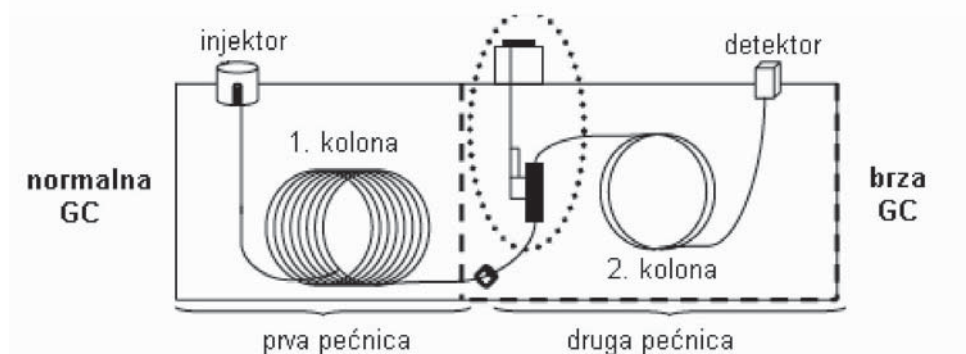
Nedostatak ove metode je taj što je njezina povećana separacijska moć primjenjiva na samo nekoliko dijelova, a ne na cijeli uzorak. Ovakav pristup za analizu velikog broja sastojaka u uzorku složenog sastava oduzima mnogo vremena. Kritični korak je i vrijeme kada određene frakcije prelaze na drugu kolonu pa i mali pomaci u vremenu zadržavanja dovode do netočnih rezultata. Iz toga proizlazi potreba za metodom koja će imati prednosti kao i MDGC, ali će biti primjenjiva na cijeli uzorak i njezina će upotreba biti jednostavnija (24).

Gore navedene karakteristike ima opsežna dvodimenzionalna plinska kromatografija (engl. *comprehensive two-dimensional chromatography*) ili GCxGC koja se može rabiti za snimanje uzoraka, ali i za kongener-specifičnu analizu. Dvodimenzionalni kromatogram nastaje kontinuiranim prenošenjem

malih bliskih frakcija eluata s prve kolone u drugu dimenziju separacije. U toj drugoj koloni separacija mora biti brza pa se upotrebljavaju kraće kolone manjeg promjera i manje debljine filma selektivne tekućine. Kako bi se separacija poboljšala, potrebne su dvije kolone koje za analit imaju različite separacijske mehanizme. Tradicionalno se rabi nepolarna kolona u prvoj dimenziji separacije, koja razdvaja analite na temelju njihove hlapljivosti, a kratka, uska polarna kolona u drugoj dimenziji koja razdvaja sastojke na temelju specifičnih interakcija sa stacionarnom fazom. Glavnu ulogu ima modulator koji akumulira i fokusira frakcije eluata s prve kolone i brzo ih injicira u vrlo uskim zonama u drugu kolonu. Shema instrumenta je prikazana na slici 4. Razdvajanje na prvoj koloni provodi se obično pod normalnim GC-uvjetima s kolonom uobičajenih dimenzija, npr. 30 m x 0,25 mm (unutarnji promjer) x 0,25 μm (debljina filma selektivne tekućine). Razdvajanje na drugoj koloni mora biti vrlo brzo da bi se izbjeglo preklapanje pikova iz dva susjedna pulsa pa su uobičajene dimenzije kolona otprilike (0,5 m do 2 m) x (0,1 mm do 0,15 mm) x 0,1 μm . Zbog uskih pikova koji se dobivaju GCxGC analizom detekcijski sustav mora brzo obrađivati podatke kako bi prikupio dovoljno podataka o svakome moduliranom piku te je najprikladniji brzi detektor kao što je spektrometar masa s analizatorom masa koji mjeri vrijeme leta [MS(TOF)].

U radu Cochran i suradnika upotrijebljena je GCxGC uz TOF-analizator masa za analizu dioksina u sedimentu. Prva GC-kolona bila je Rtx-Dioxin 2 dimenzija 60 m x 0,25 mm x 0,25 μm , dok je druga bila Rtx-500 dimenzija 2,5 m x 0,18 mm x 0,10 μm i smještena u vlastitoj pećnici. Primarna je pećnica držana na 130 °C 1 min, zatim temperatura raste brzinom od 40 °C min⁻¹ do 210 °C te 4 °C min⁻¹ do 330 °C gdje je održavana 5 min. Druga je pećnica programirana tako da njezina temperatura cijelo vrijeme bude 20 °C iznad temperature primarne pećnice (25).

Zbog potrebe za brzim i jeftinim metodama koje će se rabiti u rutini i za eventualne krizne situacije razvijene su metode biološke analize za određivanje ukupnoga toksičnog potencijala dioksinških smjesa u uzorcima okoliša. Te se metode baziraju na sposobnosti bioloških molekula (npr. enzima, receptora, antitijela) da prepoznaju jedinstveno strukturno svojstvo dioksinškog sastojka ili na sposobnosti stanica organizma da daju specifičan odgovor na dioksinške sastojke (5). Biološke



Slika 4 Shema GCxGC instrumenta

metode analize mogu se podijeliti na imunoanalize i bioanalize. Imunoanalitičke i bioanalitičke metode mogu smanjiti troškove za 50 % ili više i rabe se za analizu uzoraka s rizičnih mjesta gdje je potrebna brza analiza s brzim protokom podataka (4). Zajednička tim metodama je uporaba biološki modificiranih komponenata da se dobije specifični odgovor analita. Takvim se metodama može odrediti samo ukupna koncentracija dioksina, a ne koncentracije pojedinih kongenera kao što je slučaj s HRGC-HRMS. Unatoč tom ograničenju te su metode dobre za eliminaciju zanemarivo onečišćenih uzoraka i identifikaciju teško onečišćenih uzoraka koji se zatim analiziraju npr. HRGC-HRMS-om. Prema jednostavnim protokolima analizira se više uzoraka odjednom (26). Potrebna su daljnja poboljšanja i validacije tih metoda kako bi postale pouzdane kao i kemijske metode analize.

Razvijena je vrlo osjetljiva ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) metoda za analizu dioksina upotrebom 2,3,7-triklor-8-metildibenzo-*p*-dioksina (TMDD-a) kao surogat standarda. Pokazano je da se može rabiti za procjenu TEQ-a u mnogim realnim uzorcima. Dva su razloga zbog kojih su dioksini skupina onečišćivala koju je imunoanalitičkim metodama teže analizirati od ostalih. Prvi je njihova ekstremno mala topljivost u vodi što ograničava primjenu enzimске imunoanalize koja se pretežno provodi u vodenom mediju. Drugi je nemogućnost primjene otapala koja se mogu miješati s vodom zbog toga što dolazi do koekstrakcije raznih interferencija koje smetaju određivanju niskih koncentracija dioksina u uzorcima okoliša (27). Za ekstrakciju dioksina i ovdje se rabe nepolarne otapala kao što su heksan i toluen, ali se prije same imunoanalize uzorak prevodi u prikladnije otapalo kao što je metanol ili u prikladnu pufersku otopinu. Kod imunoanalize pročišćavanje također ostaje nuždan korak i tehnike

se uglavnom ne razlikuju puno od pročišćavanja prije standardne HRGC-HRMS analize. Glavni zadatak pročišćavanja je uklanjanje većine organskih sastojaka iz vodenog medija, posebice polarnijih sastojaka kao što su ftalati, fenoli i karboksilne kiseline. Zbog selektivnosti antitijela onečišćivala kao što su PCB i PAH predstavljaju manju smetnju nego kod standardnih metoda analize (27).

ELISA može učinkovito detektirati dioksine u različitim tlima koja se razlikuju u stupnju onečišćenja, tipu tla, udjelu organske tvari itd. Ekstrakcija i pročišćavanje najvažniji su za konačni rezultat bez obzira na metodu detekcije, a oni još uvijek uključuju intenzivni laboratorijski posao čime smanjuju potencijalne prednosti ELISE (26). Nording i suradnici u svom su radu dioksine iz uzoraka tla simultano ekstrahirali i frakcionirali s pomoću ASE-sustava unutar kojeg je dodana smjesa aktivnog ugljena i Celita, a analiza je provedena ELISA-metodom. Rezultati dobiveni usporedbom ovog postupka s klasičnim postupkom analize (Soxhlet, više kolona za pročišćavanje, HRGC-HRMS) pokazuju da postupak obećava brzo snimanje različitih uzoraka tla (26).

Sediment ima više organske tvari nego tlo i to može rezultirati većim efektom matrice, pa je potreban učinkovitiji proces pročišćavanja (13, 28). Taj proces pročišćavanja je još uvijek manje opsežan nego za HRGC-HRMS (28). ELISA je upotrijebljena u radu Nickkove i suradnika za snimanje dioksina u uzorcima sedimenta i određivanje TEQ-a pri čemu su uspoređene dvije metode pročišćavanja od kojih se višeslojna kolona silikagela pokazala boljom od mućkanja sa sumpornom kiselinom. Za neke uzorke sedimenta bilo je potrebno dodatno pročišćavanje na kolonama aktivnog ugljena (28).

U Nizozemskoj je razvijena metoda CALUX-bioanalize, odnosno metoda kemijske aktivacije gena

za ekspresiju luciferaze (engl. *chemically activated luciferase gene expression*; CALUX) koja se temelji na povećanoj proizvodnji luciferaze nakon izlaganja mišjih ili štakorskih hepatomskih stanica dioksinima. Interpretacija odziva dobivenog bioanalitičkom metodom teža je nego onog dobivenog klasičnom kemijskom metodom HRGC-HRMS-om jer su odstupanja moguća zbog toga što CALUX analizira sve toksične sastojke prisutne u ekstraktu te mogućih sinergističkih ili antagonističkih efekata (11). CALUX procjenjuje ukupnu biološku aktivnost smjese i ne zahtjeva poznavanje identiteta ili koncentracije individualnih komponenata smjese. Metoda testira sposobnost ekstrakata uzorka da povećaju ekspresiju gena odgovornog za produkciju luciferaze, a koji je pod kontrolom Ah-receptora te na taj način daje indeks TEQ-a. CALUX-bioanaliza iskazana je preko AhR zato što je on posrednik dioksinске toksičnosti. Kao i kod kemijskih analiza, ekstrakcija i pročišćavanje uzorka su kritični koraci u bioanalizi kao što je CALUX (4).

Na tablici 2. dan je pregled nekoliko novijih radova iz područja analize dioksina u uzorcima tla i sedimenta s metodama ekstrakcije, pročišćavanja i instrumentalne analize koje su pri tome korištene.

KVALITETA ANALITIČKIH POSTUPAKA

U većini laboratorija diljem svijeta, uključujući i WHO, HRGC-HRMS se rabi za određivanje dioksina u okolišnim i biološkim uzorcima te uzorcima hrane (5). Kontrola kvalitete kod HRGC-HRMS najčešće se provodi dodavanjem poznate količine obilježenih (^{13}C , ^{37}Cl) PCDD/F kongenera u uzorak. Već je prije navedeno da je instrumentacija potrebna za ovakav tip analiza vrlo skupa, a skupi su i obilježeni standardi, što je i uzrok rastu broja radova u kojima se nastoje pronaći metode kojima bi se HRGC-HRMS mogla zamijeniti barem za prvobitno snimanje uzoraka. U novijim radovima prikazanim u ovom članku nisu uvijek navedeni načini na koje je provjerena kvaliteta neke analitičke metode koja nije referentna, dok su u nekima navedeni načini, ali nisu dane konkretne brojčane vrijednosti. Zato je još uvijek teško međusobno uspoređivati različite metode analize, a pogotovo je to teško kad se radi o biološkim metodama analize dioksina koje nisu kongenerski specifične jer one ne mogu razlikovati ^{13}C i ^{12}C -izotope. U nastavku je navedeno nekoliko primjera novijih radova koji daju podatke o načinu na koji je provedena kontrola kvalitete analitičkih postupaka.

U radu Fabrellasa i suradnika (23) procijenjena je kvaliteta plinske kromatografije visokog razlučivanja spregnuta s tandemnom spektrometrijom masa (ionska stupica) za analizu dioksina u uzorcima okoliša, između ostalog i tla i sedimenta. Nakon optimiranja parametara napravljene su kalibracijske krivulje za svaki ispitivani kongener, s time da su koncentracijski rasponi bili različiti za različite homologne skupine dioksina. U svim slučajevima dobivena je dobra linearna ovisnost s korelacijskim koeficijentima od 0,9891 do 0,9990. Sudjelovanjem u tri interlaboratorijske provjere i postizanjem "z-vrijednosti" manjih od 2 (osim za jedan uzorak tla), metoda se pokazala dobrom za analizu dioksina u tlu i sedimentu.

U radu Cochran i suradnika (25) za analizu dioksina u sedimentu upotrijebljena je GCxGC-MS(TOF). Korelacijski koeficijenti kalibracijskih krivulja za 17 PCDD/PCDF-a bili su 0,995 ili viši. Učinkovitost analitičke metode vidljiva je i iz slaganja dobivenih rezultata u usporedbi s onima dobivenim s HRGC-HRMS.

Mannila i suradnici razvili su metodu ekstrakcije dioksina superkritičnim fluidom iz uzoraka tla (15). Reproducibilnost SFE-metode proučavana je usporedbom vrijednosti PCDD/PCDF-a u 5 paralelnih proba jednog uzorka tla koji je sadržavao najniže razine analita. Za 15 kongenera PCDD/PCDF-a povrati su iznosili 62 % do 97 % (osim za 2,3,7,8-TCDF; 50 %), a relativne standardne devijacije 2 % do 10 %. Reproducibilnost SFE-metode u procjeni toksičnosti analiziranih uzoraka usporediva je s onom dobivenom Soxhlet ekstrakcijom, relativne standardne devijacije TEQ-vrijednosti su između 5 % i 25 % za obje metode.

U radu Chia i suradnika (20) rabi se HS-SPME za ekstrakciju dioksina iz uzoraka tla, dok se za određivanje dioksina rabi GC-MS/MS (ionska stupica). Za kalibriranje podataka računanjem relativnog faktora odgovora (engl. *relative response factor*; RRF) rabljeni su PCDD/PCDF obilježeni s ^{13}C . Granice detekcije su u rasponu 2,2 ng g⁻¹ do 77,2 ng g⁻¹, a relativne standardne devijacije su manje od 15,8 % (koncentracije u rasponu 50 ng g⁻¹ do 250 ng g⁻¹).

Pregledom literature koja se bavi analitikom dioksina u uzorcima okoliša vidljivo je da su potrebna daljnja istraživanja, ali i odgovarajuće provjere kvalitete analitičkih metoda koje bi eventualno mogle biti jednako dobre ili još bolje od Soxhletove ekstrakcije i HRGC-HRMS u analizi dioksina.

Tablica 2 Pregled metoda analize dioksina u uzorcima tla i sedimenta

	Metoda ekstrakcije	Metoda pročišćavanja	Instrumentalna analiza	Referenca
TLO	Mučkanje s otapalom	Florisil	ELISA	13
	Soxhlet; 250 mL otapala [ψ (<i>n</i> -heksan, aceton)=88:12]; 48 h	Automatski sustav za pročišćavanje	HRGC-HRMS (izotopno razrjeđenje)	29
	SFE (CO ₂)	- ćelija za ekstrakciju je sadržavala Na ₂ SO ₄ i bazični Al ₂ O ₃ - stupica s aktivnim ugljenom i Celitom 545 (1:5)	HRGC-HRMS (praćenje odabranih iona)	15
	SPME	/	GC-IT MS/MS	20
	Soxhlet; toluen; 48 h	Višeslojna kolona silikagela, Florisil, bazični Al ₂ O ₃	HRGC-HRMS (izotopno razrjeđenje)	30
	ASE; [ψ (aceton/ <i>n</i> -heksan)=50:50]	Mučkanje s konc. H ₂ SO ₄ ; višeslojna kolona silikagela; aktivni ugljen na silikagelu	HRGC-HRMS	31
	Soxhlet; toluen; 24 h	Višeslojna kolona silikagela (silikagel, bazični silikagel, silikagel, kiseli silikagel, silikagel, Na ₂ SO ₄); Florisil; bazični Al ₂ O ₃	HRGC-LRMS (izotopno razrjeđenje)	32
SEDIMENT	USE; heksan	Višeslojna kolona silikagela (silikagel, bazični silikagel, silikagel, kiseli silikagel, silikagel, Na ₂ SO ₄)	ELISA	28
	Soxhlet; toluen; 16 h	1. kolona: AgNO ₃ , silikagel, bazični silikagel, silikagel, kiseli silikagel, silikagel, Na ₂ SO ₄ 2. kolona: bazični Al ₂ O ₃ , Na ₂ SO ₄ 3. kolona: 5 % Amoco PX21 ugljen/silikagel	GC-HRMS	33
	Mučkanje zatim USE; CH ₂ Cl ₂	Višeslojna kolona: Na ₂ SO ₄ , kiseli silikagel, bazični silikagel, AgNO ₃ + silikagel	CALUX	34
	Soxhlet; toluen; 48 h	Višeslojna kolona silikagela (Na ₂ SO ₄ , silikagel, kiseli silikagel, silikagel, bazični silikagel, silikagel, AgNO ₃ + silikagel); Florisil; bazični Al ₂ O ₃	HRGC-HRMS (izotopno razrjeđenje)	35
	Soxhlet; toluen; 48 h	Višeslojna kolona silikagela, bazični Al ₂ O ₃ , PX21 aktivni ugljen	GC-MS/MS	36
	MAE; toluen/metanol 9:1	Kombinacija više kolona: kolona silikagela, alumine, aktivnog ugljena i Celita	GC-HRMS	7

RAZINE PCDD-A I PCDF-A U TLU I SEDIMENTU

Razine dioksina u uzorcima okoliša su niske i ako nema novih izvora onečišćenja, one ostaju relativno konstantne duže vrijeme. Kako bismo dali djelomičan uvid u sadašnje stanje, naveli smo nekoliko novijih radova u kojima su analizirani dioksini u uzorcima tla i sedimenta.

Razine dioksina praćene su u uzorcima tla skupljenim na različitim lokacijama u Španjolskoj od 1993. do 1999. godine. Na lokaciji koja je određena kao pozadinska srednja vrijednost koncentracije dioksina iznosila je 0,88 pg I-TEQ g⁻¹ suhe tvari. Lokacija na

kojoj je smještena spalionica bolničkog otpada imala je povišene razine dioksina u uzorcima tla te je srednja vrijednost iznosila 3,62 pg I-TEQ g⁻¹ suhe tvari, dok dvije lokacije na kojima se nalaze spalionice gradskog otpada nisu pokazale velike razlike u koncentraciji dioksina u odnosu na pozadinsko onečišćenje. Najviše razine dioksina (srednja vrijednost 14,41 pg TEQ g⁻¹ suhe tvari za 1999. godinu) imala je lokacija koja uz spalionicu gradskog otpada ima razvijenu industriju i promet (30).

U radu u kojem su analizirane razine dioksina u uzorcima tla skupljenim u četiri spalionice opasnog otpada i nadomak njima u različitim dijelovima Kine dobivene su vrijednosti dane kao TEQ-vrijednosti. Koncentracije dioksina u uzorcima tla skupljenim u

samim spalionicama bile su između 1,9 ng TEQ kg⁻¹ i 13 ng TEQ kg⁻¹, dok su one u uzorcima skupljenim u okolici spalionica bile između 0,41 ng TEQ kg⁻¹ i 2 ng TEQ kg⁻¹ (37).

Slojevi sedimenta rabe se za proučavanje povijesti i trendova onečišćenja vodenog dijela okoliša organskim onečišćivcima. U Masanskom zaljevu u Koreji duž čije je obale smješteno oko 1300 raznih industrijskih kompleksa uzorci sedimenta uzeti su na sredini zaljeva i u blizini slapa kod postrojenja za obradu otpadnih voda. Prosječna vrijednost ukupnih PCDD/PCDF-a bila je 1,343 pg cm⁻² na prvoj i 4,567 pg cm⁻² na drugoj lokaciji, dok su prosječne TEQ-vrijednosti za ukupne dioksine iznosile 15 pg cm⁻² i 76 pg cm⁻² na prvoj, odnosno drugoj lokaciji (38).

Nekontrolirano ispuštanje toksičnih otpada u Brentellski kanal u Italiji dovelo je do izuzetno visokih koncentracija PCDD/PCDF-a, čak do 64 130 ng TEQ kg⁻¹, dok u uzorcima sedimenta iz lagune TEQ-koncentracije nisu prešle 53 ng kg⁻¹, što znači da onečišćeni sediment iz industrijskog područja nije mobilan. Usporedba koncentracija dioksina u različitim slojevima sedimenta pokazala je da je najveći priljev onečišćenja bio u sedamdesetim i ranim osamdesetim godinama 20. stoljeća i da se onečišćenje s vremenom smanjuje (8).

TEQ-vrijednosti za dioksine dobivene u uzorcima sedimenta skupljenim duž rijeke Detroit 2000. godine bile su u rasponu od 1,02 pg g⁻¹ do 284 pg g⁻¹ suhe tvari (33).

Dioksini su analizirani u tlu i sedimentu skupljenima na "vrućoj" lokaciji u Vijetnamu koja je bila izložena onečišćenju tijekom Vijetnamskog rata. Iako je rat završio prije više od 30 godina, razine dioksina su još uvijek tolike da znače prijetnju zdravlju lokalnog stanovništva. Srednja vrijednost koncentracija dioksina u uzorcima skupljenim na 10 lokacija na jezeru pokraj zračne baze je 131,9 WHO-TEQ pg g⁻¹ suhe tvari (0 cm do 20 cm dubine) i razine dioksina se smanjuju s dubinom uzorkovanog tla. U uzorcima tla skupljenim na 10 lokacija oko zračne baze vrijednosti se kreću od 4,6 WHO-TEQ pg g⁻¹ do 184 WHO-TEQ pg g⁻¹ (32).

ZAKLJUČAK

U ovome preglednom radu prikazane su metode koje se rabe u analizi dioksina u složenim okolišnim uzorcima tla i sedimenta. Iako nove metode ekstrakcije i detekcije pružaju zadovoljavajuće rezultate, za

ekstrakciju se još uvijek najviše rabi ekstrakcija u aparaturi po Soxhletu, a samo je HRGC-HRMS odobrena kao referentna metoda za detekciju dioksina. Svaka od navedenih metoda prikazanih u radu ima i prednosti i nedostataka te su potrebna daljnja istraživanja kako bi se dobili dokazi da su nove, jeftinije i brže metode dobre zamjene onima tradicionalnima.

Zahvala

Rad je napisan u okviru istraživanja na projektu "Organska onečišćenja u okolišu – raspodjela, interakcije, izloženost ljudi" (br. 022-0222882-2896) koji financijski podupire Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske.

LITERATURA:

1. Abad E, Sauló J, Caixach J, Rivera J. Evaluation of a new automated cleanup system for the analysis of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in environmental samples. *J Chromatogr A* 2000;893:383-91.
2. Danielsson C. Trace analysis of dioxins and dioxin-like PCBs using comprehensive two-dimensional gas chromatography with electron capture detection [disertacija]. Umeå: Umeå University; 2007.
3. Herceg Romanić S. Analiza tragova organoklorovih pesticida i kongenera polikloriranih bifenila u zraku, bilju, humanom mlijeku i serumu [disertacija]. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2004.
4. Reiner EJ, Clement RE, Okey AB, Marvin CH. Advances in analytical techniques for polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and dioxin-like PCBs. *Anal Bioanal Chem* 2006;386:791-806.
5. Srogi K. Overview of analytical methodologies for dioxin analysis. *Analyt Lett* 2007;40:1647-71.
6. Liem AKD, Theelen RMC. Dioxins: chemical analysis, exposure and risk assessment [disertacija]. Bilthoven: National Institute of Public Health and the Environment; 1997.
7. Verta M, Salo S, Korhonen M, Assmuth T, Kiviranta H, Koistinen J, Ruokojärvi P, Isosaari P, Bergqvist P-A, Tysklind M, Cato I, Vikelsøe J, Larsen MM. Dioxin concentrations in sediments of the Baltic Sea – A survey of existing data. *Chemosphere* 2007;67:1762-75.
8. Frignani M, Bellucci LG, Carraro C, Favotto M. Accumulation of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in sediments of the Venice lagoon and the industrial area of Porto Marghera. *Mar Pollut Bull* 2001;42:544-53.
9. Götz R, Bauer O-H, Friesel P, Herrmann T, Jantzen E, Kutzke M, Lauer R, Paepke O, Roch K, Rohweder U, Schwartz R, Sievers S, Stachel B. Vertical profile of PCDD/Fs, dioxin-like PCBs, other PCBs, PAHs, chlorobenzenes, DDX, HCHs, organotin compounds and chlorinated ethers in dated sediment/soil cores from flood-plains of the river Elbe, Germany. *Chemosphere* 2007;67:592-603.
10. Hosomi M, Matsuo T, Dobashi S, Katou S, Abe H. Survey of dioxins in Tokyo Bay bottom sediment. *Mar Pollut Bull* 2003;47:68-73.

11. Srogi K. Levels and congener distributions of PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs in environmental and human samples: a review. *Environ Chem Lett* 2008;6:1-28.
12. Focant J-F, Pirard C, De Pauw E. Automated sample preparation-fractionation for the measurement of dioxins and related compounds in biological matrices: a review. *Talanta* 2004;63:1101-13.
13. Shan G, Leeman WR, Gee SJ, Sanborn JR, Jones AD, Chang DPY, Hammock BD. Highly sensitive dioxin immunoassay and its application to soil and biota samples. *Anal Chim Acta* 2001;444:169-78.
14. Singh SB, Kulshrestha G. Gas chromatographic analysis of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans. *J Chromatogr A* 1997;774:97-109.
15. Mannila M, Koistinen J, Vartiainen T. Development of supercritical fluid extraction with a solid-phase trapping for fast estimation of toxic load of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins-dibenzofurans in sawmill soil. *J Chromatogr A* 2002;975:189-98.
16. Hashimoto S, Watanabe K, Nose K, Morita M. Remediation of soil contaminated with dioxins by subcritical water extraction. *Chemosphere* 2004;54:89-96.
17. Sanz MP, Fabrellas B. Rapid extraction of PCDD/Fs from soil and fly ash samples: Pressurized Fluid Extraction (PFE) and Microwave-Assisted Extraction (MAE). *Organohal Comp* 2004;66:86-93.
18. Srogi K. A review: Application of microwave techniques for environmental analytical chemistry. *Analyt Lett* 2006;39:1261-88.
19. Robinson C, Blow P, Dorman F. Rapid dioxin analysis using accelerated solvent extraction (ASE), multi-column sample cleanup and Rtx-Dioxin2 gas chromatography column. *Organohal Comp* 2004;66:101-6.
20. Chia K-J, Lee T-Y, Huang S-D. Simple device for the solid-phase microextraction screening of polychlorodibenzo-*p*-dioxins and polychlorodibenzofurans in heavily contaminated soil samples. *Anal Chim Acta* 2004;527:157-62.
21. Focant J-F, Pirard C, Eppe G, De Pauw E. Recent advances in mass spectrometric measurement of dioxins. *J Chromatogr A* 2005;1067:265-75.
22. Santos FJ, Galceran MT. Modern developments in gas chromatography-mass spectrometry-based environmental analysis. *J Chromatogr A* 2003;1000:125-51.
23. Fabrellas B, Sanz P, Abad E, Rivera J, Larrazabal D. Analysis of dioxins and furans in environmental samples by GC-ion-trap MS/MS. *Chemosphere* 2004;55:1469-75.
24. Marriott PJ, Haglund P, Ong RC. A review of environmental toxicant analysis by using multidimensional gas chromatography and comprehensive GC. *Clin Chim Acta* 2003;328:1-19.
25. Cochran J, Focant J-F, Sjödin A, Patterson Jr. D, Reiner E, MacPherson K, Kolic T, Dorman F, Reese S. GCxGC-TOFMS of chlorinated dioxins and furans in environmental samples. *Organohal Comp* 2004;66:846-51.
26. Nording M, Nickkova M, Spinnel E, Persson Y, Gee SJ, Hammock BD, Haglund P. Rapid screening of dioxin-contaminated soil by accelerated solvent extraction/purification followed by immunochemical detection. *Anal Bioanal Chem* 2006;385:357-66.
27. Harrison RO, Eduljee GH. Immunochemical analysis for dioxins - progress and prospects. *Sci Total Environ* 1999;239:1-18.
28. Nickkova M, Park E-K, Koivunen ME, Kamita SG, Gee SJ, Chuang J, Van Emon JM, Hammock BD. Immunochemical determination of dioxins in sediment and serum samples. *Talanta* 2004;63:1213-23.
29. Umlauf G, Christoph EH, Bidoglio G. PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in soils after the flooding of river Elbe and Mulde in 2002. *Organohal Comp* 2004;66:1356-62.
30. Eljarrat E, Caixach J, Rivera J. Levels of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in soil samples from Spain. *Chemosphere* 2001;44:1383-87.
31. Kiguchi O, Kobayashi T, Wada Y, Saitoh K, Ogawa N. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in paddy soils and river sediments in Akita, Japan. *Chemosphere* 2007;67:557-73.
32. Mai TA, Doan TV, Tarradellas J, de Alencastro LF, Grandjean D. Dioxin contamination in soils of Southern Vietnam. *Chemosphere* 2007;67:1802-7.
33. Marvin C, Alae M, Painter S, Charlton M, Kauss P, Kolic T, MacPherson K, Takeuchi D, Reiner E. Persistent organic pollutants in Detroit River suspended sediments: polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans, dioxin-like polychlorinated biphenyls and polychlorinated naphthalenes. *Chemosphere* 2002;49:111-20.
34. Hurst MR, Balaam J, Chan-Man YL, Thain JE, Thomas KV. Determination of dioxin and dioxin-like compounds in sediments from UK estuaries using a bio-analytical approach: chemical-activated luciferase expression (CALUX) assay. *Mar Pollut Bull* 2004;49:648-58.
35. Eljarrat E, Caixach J, Rivera J. Evaluation of dioxin contamination in sewage sludge discharges on coastal sediments from Catalonia, Spain. *Wat Res* 2001;35:2799-803.
36. Eljarrat E, De La Cal A, Larrazabal D, Fabrellas B, Rodriguez Fernandez-Alba A, Borrull F, Marce RM, Barcelo D. Occurrence of polybrominated diphenylethers, polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, dibenzofurans and biphenyls in coastal sediments from Spain. *Environ Pollut* 2005;136:493-501.
37. Du B, Tian HH, Liu AM, Zheng MH, Li N, Ren Y, Li LL, Zhou ZG. A primary investigation on levels of PCDD/Fs in soil of four hazardous waste incinerator plants in China. *Organohal Comp* 2008;70:1270-3.
38. Moon H-B, Choi M, Choi H-G, Ok G, Kannan K. Historical trends of PCDDs, PCDFs, dioxin-like PCBs and nonylphenols in dated sediment cores from a semi-enclosed bay in Korea; tracking the sources. *Organohal Comp* 2008;70:1379-82.

Summary

ANALYSIS OF POLYCHLORINATED DIBENZO-*p*-DIOXINS AND POLYCHLORINATED DIBENZOFURANS IN SOIL AND SEDIMENT

This review presents methods for the analysis of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) and polychlorinated dibenzofurans (PCDFs), called dioxins, in soil and sediment. These compounds are produced as by-products of different combustion processes, and because of their persistency and toxicity they present a threat for animal and human health. Due to their high organic matter content, soil and sediment can accumulate dioxins and have become important secondary emission sources. Determining dioxins in these samples is complex because dioxins are present in trace levels and have to be separated from interferences whereas other classes of organic contaminants are present in higher concentrations. After sampling, follows extraction of compounds with a suitable solvent, extract clean-up from unwanted compounds, and qualitative and quantitative analysis.

At the end of this review, we gave levels of PCDD/PCDFs found in soil and sediment samples.

KEY WORDS: *analytical procedure, environment, organochlorine compounds, pollution, Persistent Organic Pollutants (POPs)*

CORRESPONDING AUTHOR:

Darija Kožul, dipl. ing. kemije
Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada
Ksaverska cesta 2, p.p. 291
10 001 Zagreb, Hrvatska
E-mail: dkozul@imi.hr